

**BETRACHTUNG DER SECHSTEN
KOMPLEMENT - KOMPONENTE DES MENSCHEN
IN DER PATERNITÄTSGUTACHTUNG UND
VERSUCH DER DARSTELLUNG ANHAND
DER IMMUNFIXATION**

GÜNTER PREX

1987

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der
Universität München

Vorstand: Prof. Dr. W. Spann

Betrachtung der sechsten Komplement - Komponente des
Menschen in der Paternitätsbegutachtung und Versuch
der Darstellung anhand der Immunfixation

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Günter Prex

aus

München

Jahr

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. E. Liebhardt

Mitberichterstatter : Prof. Dr. W. Spann

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter :

Dekan : Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 05.03.1987

Inhalt

1. Einführung
 - 1.1. Komplement Kette
 - 1.2. Aktivierung des Komplements
 - 1.3. Biologische Bedeutung
 - 1.4. Temperaturabhängigkeit
 - 1.5. Stabilität und Lagereffekt
 - 1.6. Inaktivatoren und Inhibitoren
 - 1.7. Vorkommen und Verbreitung
 - 1.8. Sechste Komplement-Komponente
 - 1.8.1. Biochemische Daten
 - 1.8.2. C567 - Komplex
 - 1.8.3. C6-System in populations- und formalgenetischen Untersuchungen
 - 1.8.4. Genetische Lokalisation
2. Nomenklatur
 - 2.1. Nomenklaturentstehung
 - 2.2. Richtlinien zur Nomenklatur
 - 2.3. Nomenklatur des C6 - Systems
 - 2.4. Nomenklatur zukünftig entdeckter Varianten
 - 2.5. Nomenklatur und Vorkommen des C6-defizienten Genes
 - 2.6. Lage der Hauptbanden zueinander
 - 2.7. Unterscheidung in Haupt- und Nebenbanden in homozygoten und heterozygoten Individuen
 - 2.8. Differenzierung von C6 A, C6 B und C6 AB
3. Genetik
 - 3.1. Phänotypen- und Genotypenhäufigkeiten

- 3.1.1. Phänotypen in Anzahl und Prozenten
- 3.1.2. Genfrequenzen
- 3.1.3. Verteilung der Phänotypen
- 3.1.4. Erwartete Werte
- 3.1.5. Vergleich von C6-Genfrequenzen aus verschiedenen Studien
- 3.1.6. Variationsbreite der Genfrequenzen
- 3.2. Erbgangmodell
 - 3.2.1. Ausschlußwahrscheinlichkeit in der Paternitätsbegutachtung
 - 3.2.2. Konstellation des vollständigen AusschluBes (ohne Berücksichtigung von Varianten)
 - 3.2.3. Theoretische Ausschlußwahrscheinlichkeit
 - 3.2.4 Praktische Ausschlußwahrscheinlichkeit
 - 3.2.5. Vergleich von 3.2.3. und 3.2.4.
- 3.3. Verteilung von C6 in den drei Großrassen
- 3.4. C6 -Datierung und Selektionsdruck
- 3.5. Vorkommen und Häufigkeit von C6~~x~~- Varianten
- 3.6. Komplementsysteme und ihre Tauglichkeit in der forensischen Serologie
 - 3.6.1. Verwendbarkeit anderer Komplementkomponenten neben C6
 - 3.6.2. C6 in der Abstammungsbeurteilung
- 4. Aufgabenstellung
 - 4.1. Allgemeiner Teil
 - 4.2. Spezieller Teil
- 5. Material und Methode
 - 5.1. Isoelektrische Fokussierung
 - 5.1.1. Netzgerät
 - 5.1.2. Elektrophoresekammer
 - 5.1.3. Prinzip der Elektrofokussierung

- 5.1.3.1. Trägermaterial
- 5.1.3.2. pH - Gradient
- 5.1.3.3. Analytischer Fokussierungsverlauf
- 5.2. Bereitung der Gele
- 5.3. Probenauftragung
- 5.4. Elektrodenlösungen
- 5.5. Laufbedingungen
- 5.6. Proteinnachweis
 - 5.6.1. Overlay - Technik
 - 5.6.2. Immunfixation
 - 5.6.3. Färbung
 - 5.6.4. Antikörper
- 6. Ergebnisse
- 7. Diskussion und Zusammenfassung
- 8. Literaturverzeichnis

1. Einführung

1.1. Komplement - Kette

Das Komplementsystem ist ein wichtiger Bestandteil der spezifischen Immunabwehr und besteht aus einer Reihe von Globulinen, die im Serum eines menschlichen Individuums normalerweise nachgewiesen werden können. Gegenwärtig werden neun Komponenten unterschieden, C1 bis C9, wobei sich C1 in drei Untergruppen - C1q, C1r und C1s - aufspaltet. Um ihre biologische Funktion zu erfüllen, werden diese Komponenten im Sinne einer Kettenreaktion aktiviert. Es gibt zwei Hauptwege zur Aktivierung der Komplementkaskade : Den sog. " klassischen Weg ", bei dem die Aktivierung, beginnend mit C1, von einer Antigen-Antikörper-Reaktion eingeleitet wird und den sog. " alternativen Weg ", auch " Nebenschluß " oder " Bypass " genannt, bei dem die ersten Komponenten nicht eingesetzt werden, sondern die Aktivierung durch direkte Beeinflussung der im Reaktionsablauf später eingeschalteten Komponente C3 erfolgt. [17].

1.2. Aktivierung des Komplements

Vereinfacht stellt sich der klassische Weg folgendermaßen dar : Durch die Reaktion eines Antigens mit dem entsprechenden Antikörper entsteht eine allosterische Veränderung am Fc-Teil des Antikörpers, wodurch in Anwesenheit von Ca^{++} -Ionen eine Bindung zur ersten Komponente C1 ermöglicht wird. Für diesen Aktivierungsanstoß genügt ein einziger Antikörper aus der Ig M-Klasse oder zwei benachbarte Antikörper von Ig G-Subklassen. Ist das C1, genauer das C1q, gebunden und somit aktiviert, entfaltet C1s unter Mitwirkung von C1r

eine Esteraseaktivität, wodurch die Komponenten C4 und C2 beeinflusst werden und zusammen als " C3-Konvertase " das C3 spalten. Eines der Spaltprodukte, das C3a, hat chemotaktische und anaphylaktoide Aktivitäten, das andere, C3b, wirkt zum einen Phagozytose fördernd und aktiviert zum andern das C5 durch Spaltung. C5a entwickelt vergleichbare Eigenschaften wie das C3a, während C5b die Komplementkaskade weiterführt und unter Komplexbildung mit C6 und C7 eine thermostabile Bindung an der Membran eines abzuwehrenden Partikels eingeht. Die letztlich gebundenen Komponenten C8 und C9 führen schließlich die Membranzerstörung herbei.

Beim alternativen Komplementweg werden die Komponenten C1, C4 und C2 umgangen und direkt das C3 aktiviert. Die weiteren Schritte laufen über C5 bis C9 wie beim klassischen Weg ab. Als Aktivatoren von C3 kommen Endotoxine, Schlangengifte, aber auch Immunkomplexe, namentlich das Ig A in Frage. Der Angriff auf das C3 selbst erfolgt über mehrere Zwischenstufen. [28] .

Die Aktivierung der meisten Komplementkomponenten erfolgt durch proteolytische Spaltung, wobei verschiedene Spaltprodukte entstehen, die biologisch hochgradig aktiv sind.

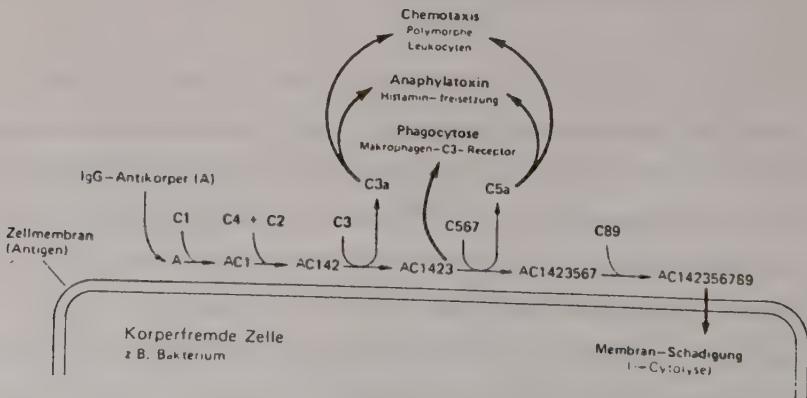


Abb. 1

Abbildung 1 zeigt die Sequenz der Aktivierung des Komplementsystems, ausgelöst durch einen Antigen-Antikörper-Komplex.

A = komplementbindender Antikörper (Ig G) des Antigen-Antikörper-Komplexes

C1 bis C9 = Komponenten des Komplementsystems.

1.3. Biologische Bedeutung

Die Kettenreaktion der Komplementkaskade - analog der Aktivierung der Blutgerinnungsfaktoren - führt über die Wirkung von Phospholipasen und Proteasen des Komplementsystems zur Ausbildung von zahlreichen " Löchern " in der Membran. [8] .

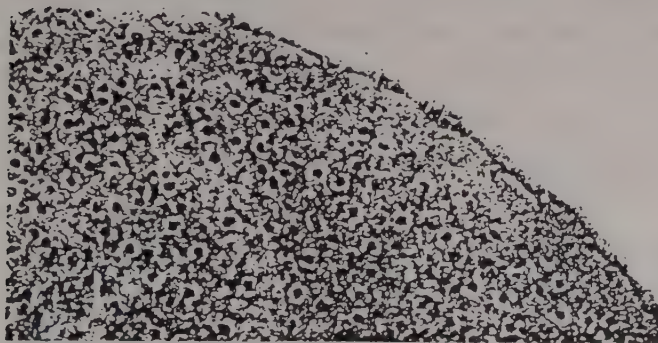


Abb.2 Komplement-Lyse. Multiple Läsionen in der Zellwand eines *Escherichia coli*-Bakteriums durch Aktivierung des Komplementsystems an Antigen-Antikörper-Komplexen. (Jede Läsion wurde durch ein einziges IgM-Molekül ausgelöst.)

Infolge dieser Membranperturbation ist die Zelle nicht mehr funktionstüchtig, stirbt ab und wird phagozytiert. Ist das Antigen keine Zelle, sondern z.B. ein Protein, kann ebenfalls das Komplement aktiviert werden. Endergebnis ist eine beschleunigte Phagozytose :
Über den Komplementfaktor C3 wird die Phagozytose eines Antigen - Antikörper-Komplement-Komplexes beschleunigt, da Makrophagen einen spezifischen C3-Rezeptor besitzen.

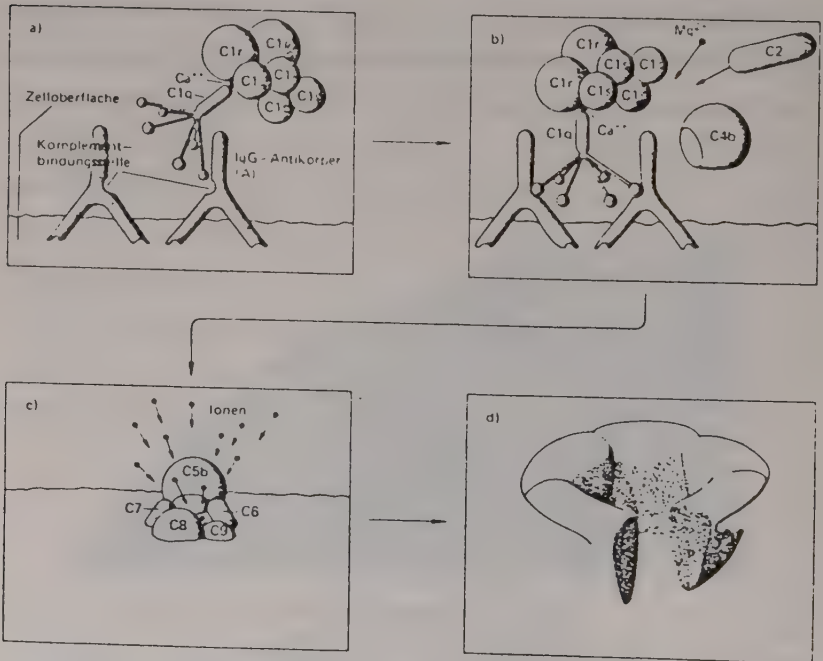


Abb.3

Abbildung 3 zeigt einige Stadien des Komplementaktivierungsmechanismus' in dreidimensionaler Darstellung.

a = Anlagerung der C1-Komponente des Komplementsystems an Ig G - Antikörper.

b = Anlagerung der C2- und C4-Komponenten.

Über verschiedene Zwischenstadien entsteht nach Anlagerung von C8 und C9 eine Membranveränderung, die man sich als Loch in der Zellmembran vorzustellen hat.

c, d = Ionengradienten können nicht mehr aufrecht erhalten werden.

Die bisherige Darstellung schilderte den Ablauf der spezifischen Immunantwort. Der schon erwähnte Komplementnebenschuß gehört funktionell zur unspezifischen Abwehr.

Wie oben angeführt, erfolgt die unspezifische Abwehr ohne Beteiligung von Antikörpern direkt durch die Polysaccharide und Lipopolysaccharide der Zellwand von Bakterien. Diese unspezifische Aktivierung des Komplementsystems beginnt mit der Aktivierung des Plasmaproteins *P r o p e r d i n*, das dann das Komplementsystem aktiviert. Das Endergebnis ist wiederum die Cytolyse bzw. beschleunigte Phagozytose über den C3-Faktor. [25].

Die folgende Abbildung soll beide Aktivierungsmöglichkeiten noch einmal verdeutlichen, wobei ein horizontaler Strich über den Komplementkomponenten hier wie auch im nachstehenden Text dessen Aktivierung anzeigen soll.

KAF : *conglutinogen-activating-factor* (= Inhibitor)

↪ : Aktivierender Vorgang

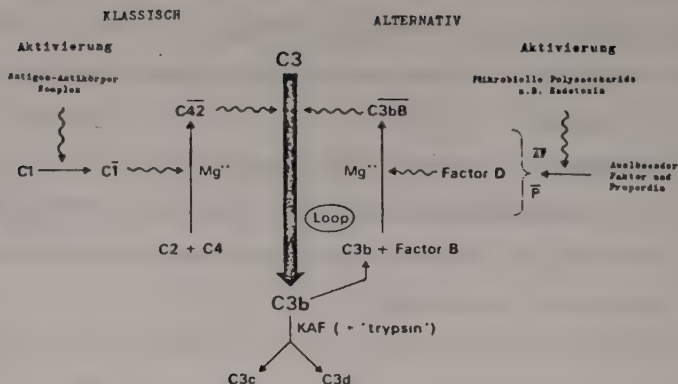


Abb.4

Im Verlauf der spezifisch wie auch unspezifisch aktivierten Komplementreaktion entstehen ferner frei bewegliche Komplementkomponenten (C3a, C5a). Sie wirken sowohl chemotaktisch auf Leukozyten als auch anaphylaktisch, indem sie die Freisetzung von Histamin aus Mastzellen bewirken. Beide Eigenschaften sind bei Entzündungsreaktionen von Bedeutung.

1.4. Temperaturabhängigkeit

Wiederholt hat man beobachtet, daß frisches Serum Eigenschaften besitzt, die verschwinden, wenn das Serum ein oder zwei Tage bei Zimmertemperatur steht oder es für 30 min. bei 56°C erhitzt wird. Im Jahre 1898 beobachtete B O R D E T erstmalig, daß Kaninchenantisera, die in frischem Zustand in hoher Verdünnung Schaferythrozyten zu lysieren vermochten, ihre Hämolysefähigkeit durch Altern oder

Erhitzen weitgehend verloren hatten. Er fand jedoch, daß die hämolytische Aktivität durch Zusatz von frischem Serum verschiedener Tierarten völlig wiederhergestellt werden konnte, nicht aber durch Zusatz von gealterten oder erhitzten Seren. Dieser im normalen Serum vorhandene hitzelabile Faktorenkomplex wurde anfänglich als "Alexin" bezeichnet und später von Bordet selbst durch den Namen Komplement ersetzt. [4].

Thermolabilität der einzelnen Komplementfaktoren bei Einwirkung von 56°C für 30 min.:

C1q	C1r	C1s	C4	C2	C3	C5	C6	C7	C8	C9
+	+	+	0	+	0	+	0	0	+	+

Tab.1 + = thermolabil 0 = thermostabil bei 56°C

1.5. Stabilität und Lagerungseffekt

Aus Tabelle 1 geht hervor, daß bis auf C4, C3, C6 und C7 alle anderen Komponenten durch Hitze inaktiviert werden. Die Erfahrung hat darüberhinaus gezeigt, daß eine Teilinaktivierung bereits durch längeres Lagern der Seren bei Raumtemperatur erfolgt, so daß von frisch abgenommenen Blutproben schnellst möglich das Serum gewonnen, und dieses umgehendst bei mindestens -40°C eingefroren werden sollte. Damit kann die Aktivität der Komplementkaskade erhalten werden. Vergleichbares gilt für Lagerungseffekte des Komplements. Im eingefrorenen Zustand ist die Aktivität konservierbar. [20]. Nur mehrmaliges Einfrieren und Wiederauf-

tauen schädigt einige Komponenten so stark, daß es auch hier zur Dekomplementierung kommt. Deshalb ist es am geeignetsten, Seren gleich nach der Gewinnung in versuchsgerechte Portionen abzufüllen und diese dann einzufrieren.

1.6. Inaktivatoren und Inhibitoren

Das Bild des Komplements ist erst vollständig, wenn man die für die meisten Komplementfaktoren vorhandenen Inhibitoren berücksichtigt, ohne die oft schwerwiegende Störungen der Immunabwehr eintreten können. Demgegenüber wirkt sich das angeborene Fehlen gewisser Komplementfaktoren oft überraschend geringfügig aus, da wie schon der Komplementnebschluß zeigt, der biologische Ablauf der wichtigsten Reaktionen mehrfach abgesichert ist, so daß Ausfälle einzelner Komponenten überbrückt werden können.

Die Komplementaktivierung kann in vitro durch Reagenzien gehemmt werden, die mit Ca^{++} oder Mg^{++} Komplexe bilden (z.B. Citrat oder EDTA): z.B. zerfällt das Makromolekül C1 bei Ca^{++} - Entzug in seine Einzelbestandteile C1q, C1r und C1s, die in dieser Form inaktiv sind. [17] .

Die verschiedenen hitzelabilen Komponenten werden wie bereits erwähnt, durch Wärme inaktiviert; C4 und C3 werden durch Ammoniak oder Hydrazin zerstört; andere Komponenten konvertieren durch verschiedene Substanzen, z.B. durch Alkylphosphate, die sich mit den aktiven Zentren der Esterase verbinden und sie so blockieren. Interessanterweise haben die letzteren Substanzen keinen Effekt auf natives C1 oder C2, welche als Proteasen vorliegen, sondern wirken erst, nach dem diese in ihre aktiven Formen überführt worden sind. [4] .

Menschliches Serum enthält auch natürlich vorkommende Inhibitoren, von denen das hitzelabile α_2 -Neuraminoglykoprotein als $\overline{C1}$ Inhibitor am besten charakterisiert ist. Seine Funktion scheint neben seiner wohl größten Bedeutung als Inhibitor des Plasmakallikreins darin zu bestehen, die Dauer der durch die Komplementaktivierung hervorgerufenen Effekte zeitlich zu begrenzen. In seltenen Fällen, wie z.B. beim " hereditären angioneurotischen Ödem " fehlt dieser Inhibitor und die Patienten sind wiederholten Anfällen von akut umschriebenen, nicht entzündlichen Ödemen ausgesetzt, ohne daß ein Zusammenhang mit spezifisch allergischen Erkrankungen bestünde. Dieser Zustand ist lebensbedrohend, da er durch ein akutes Pharynx- oder Glottisödem zum Tode führen kann [4] .

Es sind noch zwei weitere natürliche Hemmstoffe beschrieben worden. Der eine ist ein hitzestabiler Inaktivator von $C3$, der ungefähr dieselbe Größenordnung wie das Serumalbumin haben soll. Der andere, ein Inaktivator von $C6$, ist hitzelabil und könnte ein Enzym sein. Ihre biologischen Funktionen sind noch nicht bekannt.

1.7. Vorkommen und Verbreitung

Das Komplementsystem, welches mit Antikörpern derselben Spezies reagiert, wurde im Blut vieler Säugetierarten, Vögeln, Fischen (einschließlich der Knorpelfische wie der Hai) und Amphibien nachgewiesen. In vielen Fällen (z.B. zwischen Mensch, Schwein, Maus, Meerschweinchen) sind die Komponenten des Komplementsystems von einer Spezies zur anderen funktionell austauschbar, wenn auch nicht immer mit demselben Wirkungsgrad. (Bei der Perforation von Zellwänden durch Komplementeinwirkung beträgt der Durchmesser der " Löcher " für menschliches Komplement ca. $102 \text{ \AA}$ und für Meer-

schweinchenkomplement ca. 88 Å) [8].

1.8. C6

1.8.1. Biochemische Daten

Das humane C6 ist ein β_2 -Globulin, bestehend aus einer einzigen Polypeptidkette mit dem Molekulargewicht von 128 000 d [15] und mit einer Sedimentationskonstanten von 5,5 S. [16]. Es wird in der Leber synthetisiert [7] und erreicht eine Serumkonzentration von 60 $\mu\text{g/ml}$. [17].

1.8.2. C567 - Komplex

Im Verlauf der immunologischen Abwehr reagiert das C6 zusammen mit C5 und C7 mit dem bisher gebildeten Komplex EAC1qrs423.

Dabei entspricht E: Erythrozyt

A: Antikörper

C: Komplementkomponenten.

Über den genauen Ablauf der Reaktionen der drei Komponenten C5, C6 und C7 ist bislang relativ wenig bekannt. Mit Meerschweinchenserum konnte nachgewiesen werden, daß diese Komponenten mit dem EAC1qrs423-Komplex nacheinander einzeln reagieren, wogegen sie im Humanserum als Einheit zu reagieren scheinen, obgleich die drei Komponenten getrennt werden können. Einiges deutet darauf hin, daß das aktivierte C7 direkt mit der Zellmembran reagiert, wobei es fest gebunden wird und somit den entscheidenden Kontakt zur Zellmembran herstellt.

1.8.3. C6 - System in populations- und formalgenetischen Untersuchungen

Das C6-System wurde 1974 von Hobart, Lachmann und Alper entdeckt. Das C6-Molekül weist genetisch determinierte Varianten auf, die zwar keinen erkennbaren Einfluß auf die Funktion ausüben, wohl aber in der Elektrophorese unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten besitzen, so daß der Polymorphismus nachgewiesen werden kann. Dieser Nachweis bedarf eines relativ geringen methodischen Aufwandes, und zeichnet sich durch eine zuverlässige Reproduktion aus, so daß für das C6-System rasch das Interesse für populations- und formalgenetische Untersuchungen geweckt war.

1.8.4. Genetische Lokalisation

Es ist bisher nicht gelungen, die chromosomale Lokalisation des C6-Genortes ausfindig zu machen.

Vermutungen, daß der C6-Genort in der Nachbarschaft der genetischen Lokalisation des HLA-Systems liegen könnte, wie z.B. C4 oder Bf, haben sich, wie mehrere Studien zeigen, nicht bestätigt. Es ließ sich weder eine meßbare Distanz innerhalb des Genbereichs des HLA-Systems noch eine Lokalisation auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 feststellen. Damit ist C6 als von HLA unabhängig zu betrachten. [19] .

2. Nomenklatur

2.1. Nomenklaturentstehung

Seit der Entdeckung des menschlichen C6-Polymorphismus' wurden wenigstens sechs seltene Allotypen neben den zwei häufig vorkommenden Typen beobachtet. Da jedoch jedes Labor, das eine Variante entdeckt hatte, auch eine andere Nomenklatur verwendete, wurde auf dem III. Workshop am 27. Mai 1979 in Köln eine für alle verbindliche C6-Nomenklatur erarbeitet. [14] .

2.2. Richtlinien zur Nomenklatur

Für ein besseres Verständnis der C6-Nomenklatur und um Mißverständnissen vorzubeugen, wurde große Sorgfalt darauf verwendet, eine anschauliche Nomenklatur zu erstellen. In Anlehnung an bereits bestehende Nomenklaturen für andere Komplementkomponenten und unter Berücksichtigung der Bezeichnung der schon bekannten häufigeren C6-Allele wurde eine Nomenklatur gewählt, in deren Systematik jederzeit neu entdeckte Varianten eingegliedert werden können. Sie steht in Einklang mit den Richtlinien der " Human Gene Nomenclature ", die am 5. Gene Mapping Workshop im Juni 1979 in Edinburgh vorge schlagen und angenommen worden sind. Jede Variante des C6-Systems ist jetzt charakterisiert durch die relative Lage ihrer Hauptbande am isoelektrischen Punkt (pI) zu der Hauptbande einer der zwei häufigen Allotypen. Genaue Messungen der Entfernungen zwischen den Banden der verschiedenen Allotypen - wie sie beim C3 und Bf-System zur Anwendung kommen - wären für die Standardisierung auf den Iso-

elektrofokussierungsgelen zu schwierig gewesen.

2.3. Nomenklatur des C6-Systems

Die zwei häufigsten Allotypen werden mit C6 A (A: für "acid" pI), und C6 B (B: für " basic " pI), die betreffenden Allele mit C6⁺A (früher C6^A) und C6⁺B (früher C6^B) bezeichnet. [14]. Weitere Varianten mit einem mehr im Sauren gelegenen pI als das häufige C6 A bzw. mit einem mehr im Basischen gelegenen pI als das gewöhnliche C6 B, erhalten zusätzlich zu ihrem großen Buchstaben ein numerisches Suffix, zu dem der entsprechenden Hauptbande von C6 A bzw. C6 B :

C6 Allele	C6 Allotypen
C6 * A3	C6 A3
C6 * A2	C6 A2
C6 * A1	C6 A1
C6 * A	C6 A
C6 * M	C6 M
C6 * B	C6 B
C6 * B1	C6 B1
C6 * B2	C6 B2

Tab. 2

2.4. Nomenklatur zukünftig entdeckter Varianten

In Zukunft werden alle neu entdeckten intermediären Varianten ein zweites numerisches Suffix erhalten. Hypothetische Varianten zwischen C6 B1 und C6 B2 würden dann mit C6 B11, C6 B12, usw. bezeichnet werden. Varianten zwischen den häufigen C6 A und C6 B - bisher ist nur eine Variante bekannt - werden als C6 M bezeichnet.

2.5. Nomenklatur und Vorkommen des C6 defizienten Genes

Das C6 defiziente Gen wird mit C6 * QO (QO: Quantitative Variante ohne Aktivität) , der Allotyp mit C6 QO benannt.

Glass et al. beschrieben in vier Familien die Existenz eines solchen C6 * QO, das in einer Familie interessanterweise mit einer Verminderung der siebten Komplementkomponente gekoppelt war. [24]. In einer anderen Familie wurden zwei homozygot C6-defiziente Mitglieder festgestellt. [2] .

2.6. Lage der Hauptbanden zueinander

Bisher wurden sechs Varianten identifiziert. Sie sind in der vorangegangenen Tabelle 2 und im nachfolgenden schematischen Diagramm (Abb. 5) zusammen mit den häufigen Allotypen A und B dargestellt. Es sind dabei nur die Hauptbanden jeder Variante berücksichtigt, da, wie durch nachstehendes Kapitel 2.7. verständlich wird, eine klare Darstellung sonst nicht möglich wäre.

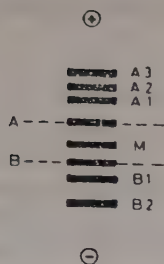


Abb. 5

2.7. Unterscheidung in Haupt- und Nebenbanden in homozygoten und heterozygoten Individuen.

Bei der Identifizierung der C6-Phänotypen A und B und ihrer Varianten müssen jeweils mindestens sieben Banden in die Betrachtung eingeschlossen werden, wobei in homozygoten Individuen eine Bande, und in heterozygoten Individuen zwei Banden hervorstechen und als Hauptbanden bezeichnet werden.

In homozygoten Individuen sind neben der Hauptbande mindestens eine anodale und eine kathodale Nebenbande zu erkennen; zusätzliche Nebenbanden - eventuell aus Doppelbanden bestehend - finden sich auf der kathodalen wie auf der anodalen Seite der Hauptbanden. Die häufig erscheinenden Allotypen A und B unterscheiden sich nur durch die Verschiebung der Haupt- und Nebenbanden im isoelektrischen Punkt. Seltene Allotypen zeigen untereinander ähnliche, jedoch in sich kürzere oder längere Bandenmuster. Einige dieser Typen weisen eine große Variabilität in den Abständen ihrer Nebenbanden im Vergleich mit denen der häufig gefundenen Allotypen auf. In heterozygoten Individuen erscheint das C6-Muster als Summe zweier homozygoter Typen mit zwei Hauptbanden gleicher Intensität. Für

die Identifikation der Bandenmuster wird die Lage der Hauptbanden gewählt. [14].

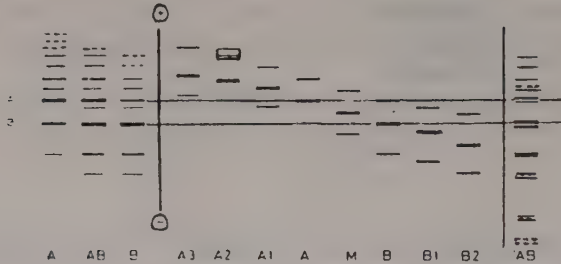


Abb. 6

Das Schema zeigt alle bisher entdeckten Allotypen. Vollständige Muster der häufigen Phänotypen sind links, Doppelbandenmuster rechts zu erkennen. In der Mitte sind nur Hauptbanden und die hervorstechendsten Nebenbanden aufgeführt.

Für die heterozygoten Phänotypen läßt sich ein ähnliches Modell aufbauen, wie in nachfolgender Zeichnung gezeigt wird. Wiederum sind nur die Hauptbanden und die stärksten Nebenbanden dargestellt.

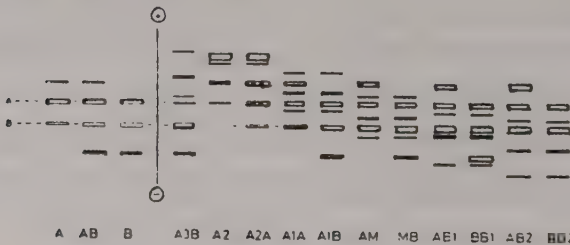


Abb. 7

2.8. Differenzierung von C6 A, C6 B und C6 AB

Die Erkennung von C6 A bereitet im allgemeinen wenig Schwierigkeiten, die Unterscheidung zwischen C6 B und C6 AB jedoch beruht auf der Erkennung der Hauptbanden und auf der Verschiebung der gesamten anodalen Nebenbanden, die dementsprechend sorgfältig bestimmt werden müssen. (Abb. 8 und Abb. 6).

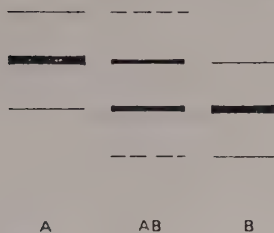


Abb. 8

3. Genetik

3.1. Phänotypen - und Genotypenhäufigkeiten

In einer 1982 erstellten Arbeit [21], in der Blute von 602 Individuen des süddeutschen Raumes mit der Overlay-Technik untersucht worden sind, wurden folgende Phänotypen- und Genotypenhäufigkeiten im C6-System gefunden :

3.1.1. Phänotypen in Anzahl und Prozenten

Phänotyp	Beobachtet n	%
C6 A	269	44,684
C6 B	66	10,963
C6 AB	264	43,853
C6 B-Varianten	3	0,5
Insgesamt	602	100,000

Tab.3

(Angaben in absoluten Zahlenwerten und Prozentzahlen).

Da die Phänotypenhäufigkeit aller Varianten zusammen nur 0,5% beträgt, kann man zur Genfrequenzberechnung vereinfacht das C6-System als nur aus zwei allelen Genen bestehend (C6 = A und C6 = B) betrachten.

3.1.2. Genfrequenzen

Demnach lassen sich die Häufigkeiten der dieses System kontrollierenden Gene nach der Methode von Wiener und Vaisberg berechnen:

$$C6 \times A = \frac{AA}{100} + \frac{AB}{2 \times 100}$$

$$C6 \times B = \frac{BB}{100} + \frac{AB}{2 \times 100}$$

$$C6 \times B-Var. = \frac{Var.}{200}$$

Dabei gilt für :

AA : Frequenz des Phänotyps C6 A

BB : Frequenz des Phänotyps C6 B

AB : Frequenz des Phänotyps C6 AB

Var: Frequenz des Phänotyps C6 B-Varianten.

Legt man zur Berechnung der Häufigkeit obige Zahlenwerte zugrunde, ergeben sich folgende Genfrequenzen :

$$C6 \cdot A = \frac{44,684}{100} + \frac{43,853}{2 \times 100} = 0,666$$

$$C6 \cdot B = \frac{66}{100} + \frac{43,853}{2 \times 100} = 0,331$$

$$C6 \cdot B\text{-Var.} = \frac{0,5}{200} = 0,003$$

$$\begin{array}{c} \text{=====} \\ 1,000 \end{array}$$

3.1.3. Verteilung der Phänotypen

Die Berechnung der theoretischen Phänotypenverteilung erfolgt nach Hardy - Weinberg, wonach in einer großen, gegebenen Population im Idealfall keine Mutation, keine Selektion und uneingeschränkte Panmixie die Regel ist, gemäß der Formel :

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

In einer solchen Idealpopulation werden die Gene nach den Mendel - schen Regeln vererbt. Die Allelfrequenzen bleiben konstant.

Für das C6-System berechnen sich hieraus folgende phänotypische Häufigkeiten :

$$C6 A : p^2 = 0,666^2 = 44,4 \%$$

$$C6 B : q^2 = 0,331^2 = 11,0 \%$$

$$C6 AB : 2pq = 2 \times 0,666 \times 0,331 = 44,1 \%$$

=====

$$99,5 \%$$

3.1.4. Erwartete Werte

Daraus ergibt sich der theoretische Wert nach der Formel :

Phänotypenhäufigkeit x n

$$C6 A : 44,4 \% \times 602 = 267,3$$

$$C6 B : 11,0 \% \times 602 = 66,2$$

$$C6 AB : 44,1 \% \times 602 = 265,5$$

$$C6 Var. : 0,5 \% \times 602 = 3$$

=====

$$602$$

3.1.5. Vergleich von C6-Genfrequenzen aus verschiedenen Studien

	Populationen	C6 → A	C6 → B	C6 → Var.	n
Hobart et al. 1974	Europäer	0,611	0,374	0,015	99
Alper et al. 1975	Europäer	0,646	0,333	0,021	264
Hobart & Lachmann 1976	Europäer	0,621	0,361	0,019	189
Olving et al. 1977	Norweger	0,611	0,389	0,0	81
Rittner et al. 1978	BRD	0,613	0,379	0,008	194
Kühnl & Kreckel 1979	BRD	0,646	0,346	0,008	254
Mauff et al. 1980	BRD	0,606	0,381	0,013	1004
Rittner et al.	BRD (Bonn)	0,621	0,376	0,00026	194

Tab. 5

3.1.6. Variationsbreite der Genfrequenzen

Hobart, Lachmann und Alper geben folgende Variationsbreiten an

[6] :

Rasse	C6 + A	C6 + B	C6 + Var.
	.68	.44	.032
Europäer	.61	.37	.015
	.54	.31	0
	.69	.44	.093
Asiaten	.59	.35	.05
	.49	.26	.007
	.65	.47	.103
Negride	.56	.38	.06
	.47	.29	.016

Tab. 6

3.2. Erbgangmodell

In Untersuchungen mit eineiigen Zwillingen [21] wurden hinsichtlich Mutter - Kind - Konstellationen wiederholt Ergebnisse erzielt, wonach auf einen

autosomal kodominanten Erbgang

zu schließen ist. [13] .

3.2.1. Ausschlußwahrscheinlichkeit in der Paternitätsbegutachtung

Geht man beim C6-System von zwei kodominanten Allelen aus, so bestehen vollständige Ausschlußmöglichkeiten wie folgt :

3.2.2. Konstellationen des vollständigen Ausschlusses

(ohne Berücksichtigung der Varianten)

C6 Phänotyp von	Mutter	Kind	Mann
	C6 A	C6 A	C6 B
	C6 A	C6 B	C6 A
	C6 A	C6 AB	C6 A
	C6 AB	C6 A	C6 B
	C6 AB	C6 B	C6 A
	C6 B	C6 A	C6 B
	C6 B	C6 AB	C6 B
	C6 B	C6 B	C6 A

Tab. 4

Ein Mann vom heterozygoten C6 AB - Typ hat also im C6-System keinerlei Ausschlußmöglichkeiten.

3.2.3. Theoretische Ausschlußwahrscheinlichkeit

Die Ausschlußwahrscheinlichkeit berechnet man mit Hilfe der Allelenhäufigkeit nach der Formel von Prof. Steinhaus :

$$P' = P \times Q (1 - PQ)$$

P und Q stellen die Allelenfrequenzen dar. Die Anwendbarkeit der Formel ist gegeben, wenn

1. Die Heterozygoten und die Homozygoten klar voneinander zu unterscheiden sind und
2. ein kodominanter Erbgang vorliegt.

Beide Voraussetzungen sind im C6-System erfüllt.

Aus P' errechnen sich folgende Ausschlußwahrscheinlichkeiten :

$$\begin{aligned} P' &= PQ (1 - PQ) = 0,666 \times 0,331 (1 - 0,666 \times 0,331) = \\ &= 17,18 \% \end{aligned}$$

Ein Vergleich dieses Wertes mit der max. erreichbaren Ausschlußwahrscheinlichkeit von 18,75 % zeigt, daß es sich beim C6-System für die forensische Begutachtung um ein sehr informationsstarkes System handelt.

3.2.4. Praktische Ausschlußwahrscheinlichkeit

Hierbei kommen nur diejenigen Fälle zum Tragen, bei denen die in Frage kommenden Männer durch das C6-System als sichere Nichtväter ausgeschlossen werden können.

In einer populationsgenetischen Untersuchung [21] wurden von 69 möglichen Vätern vier durch das C6-System vollständig ausge-

schlossen.

Dies entspricht einer praktischen Ausschlußwahrscheinlichkeit von 5,8 %.

3.2.5. Vergleich von 3.2.3. und 3.2.4.

Vergleichswerte von theoretischer und praktischer Ausschlußwahrscheinlichkeit :

theoretisch	praktisch	$\frac{P}{T} \times 100 (\%)$
T (%)	P (%)	
17,18	5,8	33,76

Tab. 5

Die praktische Ausschlußwahrscheinlichkeit erreicht demnach nur ein Drittel der theoretischen Ausschlußchance.

Die Ursache liegt größtenteils darin, daß die Vaterschaftsklage in den meisten Fällen begründet ist, d.h. daß in vielen Fällen der angegebene Mann letztlich auch der biologische Vater ist.

Nach Prof. Saller beträgt die praktische Ausschlußrate generell etwa 40 % der theoretischen Ausschlußwahrscheinlichkeit, so daß in der oben zitierten Arbeit der Wert mit 33,76 % gemäß Prof.

Saller als realistisch anzusehen ist.

3.3. Verteilung von C6 in den drei Großrassen

C6 weist für die Vaterschaftsbeurteilung eine günstige Allelenverteilung nicht nur bei Weißen, sondern auch in negriden und asiatischen Bevölkerungen auf. [5]

3.4. C6 - Datierung und Selektionsdruck

Da die Genfrequenzen in obigen Populationen bei den häufigeren C6 - Typen sehr ähnlich sind, kann man auf einen alten Polymorphismus des C6-Systems schließen, der noch vor Entstehung der Rassen manifest geworden sein muß. Durch diese Feststellung und durch die gute Übereinstimmung der Wechselbeziehungen im Populationsgleichgewicht liegt der Schluß nahe, daß auf den C6-Allelen ein nur unwesentlicher Selektionsdruck lastet.

3.5. Vorkommen und Häufigkeit von C6 * - Varianten.

Wie bereits unter 3.1.1. erwähnt, beträgt die Phänotypenhäufigkeit aller C6 Varianten zusammen nur 0,5 %, so daß eine Kombination dieser Allele ein extrem seltenes Ereignis darstellt, ausgenommen in isolierten Populationen. Dies unterstreicht ein Beispiel aus Ghana. Aus diesem Land mit seinen bis heute bestehenden kleinen, in sich geschlossenen Lebensgemeinschaften stammt der bisher einzige bekannte Träger einer C6 * - Varianten in homozygoter Konstellation.

3.6. Komplementsysteme und ihre Tauglichkeit in der forensischen Serologie

3.6.1. Verwendbarkeit anderer Komplementkomponenten neben C6

C8 dürfte wegen des großen Mangels an C8-defizienten Seren, wodurch die Nachweismethode erschwert ist, vorerst keine größere Anwendung finden. C7 und Faktor D haben eine ungünstige Allelenverteilung. C4 wird durch den ungeheuer großen genetischen Polymorphismus keinen Zugang in die Vaterschaftsbegutachtung erhalten. C2 besitzt eine geringere Ausschlußchance (2,8 %, Bonner Raum [3]), könnte jedoch wegen seiner HLA-Kopplung an Bedeutung gewinnen. [1].

3.6.2. C6 in der Abstammungsbeurteilung

Im C6-System stehen die beobachteten und erwarteten Werte der Phänotypen in einem sehr guten Verhältnis zum Hardy - Weinberg - Gleichgewicht. Die Genfrequenzen sind in obiger Studie für C6 * A mit 0,666, für C6 * B mit 0,331 und für C6 * Var. mit 0,005 bestimmt worden. Ihre Bezeichnung folgt den vorgeschlagenen Richtlinien der " Human Gene Nomenclature " vom 5. Gene Mapping Workshop, der 1979 in Edinburgh stattfand.

Unter 602 untersuchten Seren fanden sich drei Phänotypen mit C6 - Var. - Typus mit folgenden allotypischen Merkmalen : AB2, BB2 und AB1. Durch Familienuntersuchungen konnte keine Abweichung von den Mendelschen Vererbungsregeln festgestellt werden. [10] .

Der Vergleich bisher ermittelter Genfrequenzen verschiedener europäischer Populationen zeigt ein zufriedenstellendes Maß an Überein-

stimmung.

Obwohl das untersuchte Material noch relativ gering ist, hat die Aufnahme des C6-Systems in die Vaterschaftsbegutachtung aufgrund der folgenden Merkmale ihre Berechtigung :

- Das Nachweissystem mit der Agarose-Overlay-Technik ist trotz aufwendiger Technik gut standardisierbar
- C6 hat eine isolierte Ausschlußwahrscheinlichkeit von 17,18 ‰
- Bislang sind keine Abweichungen zu den Mendelschen Vererbungsregeln festgestellt worden.

4. Aufgabenstellung

4.1. Allgemeiner Teil

Die Entdeckung der ABO - Blutgruppen durch Landsteiner [11] eröffnete auf dem Gebiet der Medizin, der Immunologie und der Biologie ein weites Betätigungsfeld, das trotz der enormen Anzahl von bislang gefundenen Blutgruppenmerkmalen und -systemen als noch nicht abgeschlossen betrachtet werden muß. Im weitesten Sinn kann man unter dem Begriff " menschliche Blutgruppen " alle erblichen Merkmale des menschlichen Blutes verstehen, so daß das Komplementsystem in diesen Komplex eingereiht werden kann. Alle gefundenen Blutgruppensysteme weisen einen Strukturpolymorphismus [3 & 12] auf, der dazu beiträgt, die genetische Ausstattung eines Individuums allein, einer Gruppe oder einer Population zu charakterisieren. Untersuchungen dazu sind deshalb von großem Interesse, da Phäno- und Genotyp in einem direkten Bezug stehen. Dies ist von besonderer Bedeutung für die Paternitätsbegutachtung, wo mit Hilfe der Erbganganalyse versucht wird Merkmalsunterschiede bzw. -übereinstimmungen auf Unterschiede bzw. Übereinstimmungen der genetischen Information zurückzuführen. Zum Nachweis der verschiedenen Blutgruppenmerkmale sind unterschiedliche, dem jeweiligen System am besten zugängliche Verfahren entwickelt worden.

Für alle ladungstragenden Substanzen, wie Peptide, Enzyme oder Plasmaproteine, hat die Elektrophorese [26] als vielfach angewandte Darstellungsmethode zunehmend an Bedeutung gewonnen.

Eine relativ neue, leistungsfähige Variante dieser Technik, die die physiko-chemischen Eigenschaften des Untersuchungsobjektes ausnutzt, stellt die isoelektrische Fokussierung dar. In Kombi-

nation mit immunologischen Prinzipien, wie z.B. die Antigen-Antikörper-Bindung, gewinnt dieses analytische Trennverfahren auf der Ebene der Proteine als primäre Genprodukte immer mehr an Bedeutung, die besonders in biologisch-medizinischen Forschungsbereichen wie der Genetik, der Immunologie oder der Serologie zum Tragen kommt.

Die Untersuchung dieser Arbeit basiert auf einem derartigen Trennverfahren.

4.2. Spezieller Teil

Ziel der Untersuchung war es, zu überprüfen, ob die sechste Komponente neben der sehr aufwendigen Overlay-Methode auch mit der technisch einfacheren isoelektrischen Immunfixation dargestellt werden kann.

Da diese Methode für die Routineuntersuchung geeigneter erscheint, wäre die Voraussetzung geschaffen, das C6-System zur Erhöhung des bisherigen Informationswertes über Blut- und Serummerkmalsysteme in die Paternitätsbegutachtung aufzunehmen.

5. Material und Methode

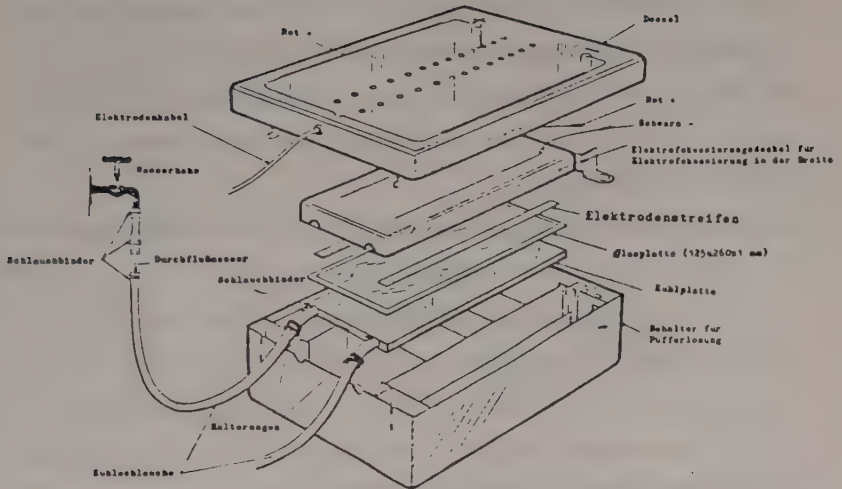
5.1. Isoelektrische Fokussierung

5.1.1. Netzgerät

Als Netzgerät wurde LKB 2103 - 020 mit einer variablen Ausgangsspannung von 0 - 2000 V verwendet.

5.1.2. Elektrophoresekammer

Als zugehörige Flachbett - Apparatur wurde die Multiphorkammer 2117 benutzt. Nachstehende Zeichnung gibt die Apparaturanordnung wieder :



Multiplex Elektrophoresiskammer für
Dünnschichtelektrofokussierung von
Polyacrylamidgelen.
Elektrofokussierung in der Breite

Abb. 9

5.1.3. Prinzip der Elektrofokussierung

Die isoelektrische Fokussierung oder kurz Elektrofokussierung, unterscheidet sich zu anderen Elektrophoreseverfahren dadurch, daß zwischen den Polen ein pH-Gradient aufgebaut wird. Damit wird ein ladungstragendes Teilchen, wie z.B. ein Peptid, Protein oder ein Enzym, das als multivalenter Elektrolyt ionisierbare Gruppen aufweist, im elektrischen Feld bis zu dem Punkt wandern, an dem

der pH-Wert der Umgebung seinem isoelektrischen Punkt entspricht. Dieser pH-Wert wird als pI bezeichnet und stellt für die Trennschubstanz bei einer Ionenstärke von 0 (Null) eine charakteristische physikalische Konstante dar. Das Nachweisverfahren ist bereits so gut ausgereift, daß in sehr engen pH-Bereichen Proteine mit unterschiedlichen pI-Werten von weniger als 0,01 pH-Einheiten sicher analysiert werden können.

Die pH-Differenz ist gemäß folgender Formel [22] berechenbar:

$$pI = 3 \left(\frac{D (dpH / dx)}{E (- du / dpH)} \right)^{1/2}$$

D : Diffusionskoeffizient des Proteins

E : Feldstärke (V/cm)

dpH/dx : pH-Gradient

du/dpH : Richtungskoeffizient des Proteins

Da die Probenbestandteile im Trennsystem an der Stelle ihres pI-Wertes konzentriert werden, ist diese relativ neue Methode als (Iso -) Elektrofokussierung benannt worden.

5.1.3.1. Trägermaterial

Die analytische Fokussierung wird mit Hilfe von Polyacrylamidgelen als Träger durchgeführt. Diese Gele sind im wesentlichen durch die Gelkonzentration T und den Vernetzungsgrad C charakterisiert, die die Porengröße des Polyacrylamidgels bestimmen.

$$T = \frac{a + b}{m} \times 100$$

a: Acrylamid (g)

b: Bis-acrylamid (g)

$$C = \frac{b}{a + b} \times 100$$

m: Totalvolumen der Polymerisationslösung (cm³)

Eine ausreichende mechanische Stabilität des Gels besteht bei einer Konzentration $T = 5 \%$, einem Vernetzungsgrad $C = 3 \%$ und einer Schichtdicke von 1 mm. Das Gel ist in dieser Zusammensetzung transparent und zeigt keine Siebungseffekte für globuläre Proteine bis zu einem Molekulargewicht von 2×10^5 D. Wegen seiner rein synthetischen Herkunft ist das Gel gegenüber enzymatischer Aktivität, pH-Einflüssen, Lösungsmitteln und Hitze stabil. Ferner können elektroosmotische Eigenschaften vernachlässigt werden, da keine geladenen Gruppen vorliegen.

5.1.3.2. pH - Gradient

Die Elektrofokussierung setzt einen linearen und stabilen pH - Gradienten innerhalb der Trennstrecke voraus. Er wird von Ampholine Trägerampholyten aufgebaut, die aus einem Gemisch niedermolekularer aliphatischer Polyamino-polysäuren mit molaren Massen von $300 - 1000 \text{ g mol}^{-1}$ und unterschiedlichen pH-Bereichen von 2,5 - 11 zusammengesetzt sind. Der Gradient wird durch Zusatz von mindestens 2 % Ampholine zum Trägermedium aufgebaut. Elektrodenlösungen stellen die Verbindung von Elektrode zum Trenngel her, wobei an der Kathode eine stärker basische und an der Anode

eine stärker saure Elektrodenlösung als der gewählte pH-Bereich der Trägerampholyten verwendet wird. Dadurch wird verhindert, daß die geladenen Ampholyte, nachdem die Spannung angelegt ist und die Wanderung zur Elektrode umgekehrter Polarität einsetzt, über die Trennstrecke hinausgeraten. Der pH-Gradient, der von den Elektroden zur Mitte hin aufgebaut wird, ist nach ca. 60 - 80 min. vollständig ausgebildet.

5.1.3.3. Analytischer Fokussierungsverlauf

Ohne Vorfokussierung werden die Serumproben auf das Gel aufgebracht und die fertig vorbereitete Platte auf den Kühlblock der Multiphor-Kammer gelegt. Der obere und untere Rand der Platte wird von jeweils einem Filterstreifen (260 x 6 x 1 mm) im Abstand von 10 cm begrenzt. Ein Streifen ist mit anodischer, der andere mit kathodischer Elektrodenlösung getränkt. Ein Elektrodendeckel stellt schließlich den Kontakt zum Trenngel her.

Nach Anlegen der Gleichspannung setzt die Wanderung der geladenen Teilchen im elektrischen Feld ein. Die Stromstärke ist zu Beginn der Fokussierung noch relativ hoch, da sowohl die Trägerampholyte als auch die Probenbestandteile positive oder negative Ladungen tragen. Da die Stromstärke mit zunehmender Fokussierungsdauer abnimmt, die Spannung jedoch möglichst hoch sein sollte, werden optimale Strom- und Spannungswerte durch eine konstante elektrische Leistung erreicht, die deshalb so gewählt werden sollte, daß eine möglichst hohe Auflösung bei relativ kurzer Analysenzeit und nur in Abhängigkeit von der Geltemperatur erreicht wird. Eine zu hohe Stromstärke am Anfang der Laufzeit könnte eine Überhitzung des

Dunnschichtgels nach sich ziehen und die Zerstörung des Probenmaterials verursachen. Hat die Stromstärke ihr unteres Limit erreicht und sinkt nicht mehr weiter ab, ist die Fokussierung beendet.

5.2. Bereitung der Gele

Bei den Versuchsreihen kamen zwei verschiedene Gele zur Anwendung. Zum einen LKB Ampholine^R PAGplates mit einem pH-Bereich von 5,5 - 8,5, zum anderen wurden selbstgefertigte Polyacrylamidgele verwendet, die wie folgt zusammengestellt waren :

14 ml 10 %iges Acrylamid

14 ml 0,3 %iges Bis-acrylamid

5 µl TEMED (Bio - Rad, Kat.-Nr. 161 - 0800)

2 ml Ampholine^R (LKB Instruments) entsprechend dem Gesamtvolumen von 1,5 ml, resultierend aus 0,5 ml pH 5 - 8 und 1 ml pH 6 - 8.

Als Polymerisator wurde 0,5 ml einer 1 %igen Ammoniumpersulfatlösung verwendet.

Das nach eigenen Modifikationen hergestellte Gel hat somit eine Gelkonzentration T von 5,08 %, einen Vernetzungsgrad C von 2,91 % und eine Dicke von 1 mm.

Die oben angeführten Reagenzien werden gemischt und für ca. 3 min. entgast. Anschließend werden sie mit einer Spritze in das vorbereitete Plattensystem gefüllt, das nach folgendem Modus aufgebaut war :

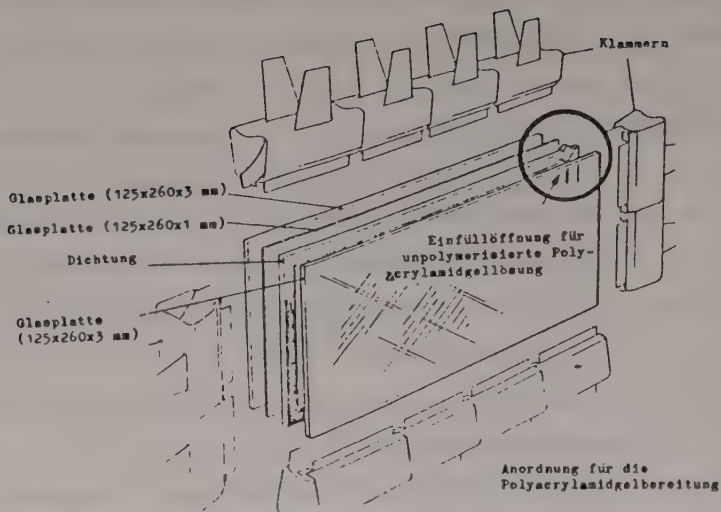


Abb. 10

Nachdem das unpolymerisierte Polyacrylamidgel ganz in die Küvette eingefüllt war, wurde es für ca. 1 h zum Polymerisieren an einen erschütterungsfreien Ort gestellt. Licht war durch Verwendung von Ammoniumpersulfat zur Polymerisation nicht nötig.

Nach dem Polymerisieren wurden die Klammern und die äußeren dicken Glasplatten entfernt (erleichtert das Öffnen der Küvette) und das Gel für eine weitere Stunde bei $+4^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Das Öffnen der Glaskammer erfolgte nach untenstehendem Prinzip :

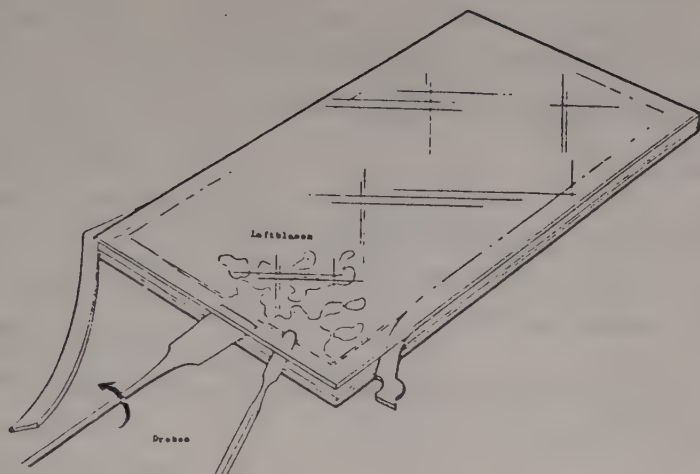


Abb. 11

5.3. Probenauftragung

Ca. 5 - 7 μ l Serumproben wurden mittels 5 x 12 mm² großen Whatman 1 MM papers 1,5 cm von der Anode entfernt auf das Gel placiert, wobei die Papierstückchen mit der 5 mm langen Seite parallel zur Elektrode aufgelegt wurden.

5.4. Elektrodenlösungen

Im Bereich der Geloberfläche, die mit den Elektroden in Kontakt kommt, wurden jeweils 1 cm breite Papierstreifen aufgelegt. Beide Streifen wurden mit folgenden Elektrodenlösungen getränkt :

Anodaler Streifen :

0,025 M Asparaginsäure (0,3327 g/100 ml)

0,025 M Glutaminsäure (0,3670 g/100 ml)

Kathodaler Streifen :

0,025 M Arginin (0,4358 g/100 ml)

0,025 M Lysin (0,3650 g/100 ml)

12 ml Äthylendiamin (12 %)

Die für die Fokussierung fertiggestellte Platte besaß somit folgendes Aussehen :

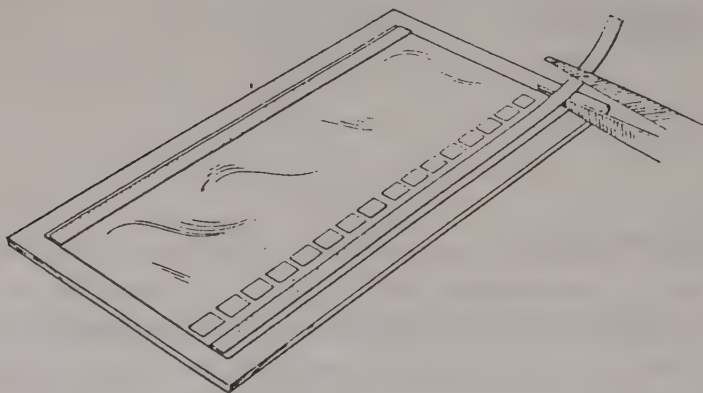


Abb. 12

5.5. Laufbedingungen

Aus den Versuchsreihen zur Agarose-Overlay-Technik [21], die ebenfalls mit der Isokussierung im Polyacrylamidgel durchgeführt wurden, waren die Auftrennungsbedingungen für C6, wie pH -

- Bereich, Leistung (W), Stromstärke (mA), Spannung (V), Fokussierdauer (min.), Laufzeit bis zur Abnahme der Filterpapierplättchen (min.) und die Kühltemperatur ($^{\circ}\text{C}$) bekannt und wurden für die Isoelektrofokussierung im Polyacrylamidgel mit anschließender Immunfixation übernommen.

Die genauen Laufbedingungen gibt Tabelle 6 wieder :

pH - Bereich	5,5 - 8,5
Leistung (W) max.	25
Stromstärke (mA) max.	25
Spannung (V) max.	1800
Fokussierdauer (min.)	240
Kühltemperatur ($^{\circ}\text{C}$)	10
Abnahme der Filterplättchen nach (min.)	90
Elektrodenabstand (cm)	9,5

Tab. 6

5.6. Proteinnachweis

5.6.1. Overlay - Technik

Diese Technik, erstmals 1972 angewandt [6] und bis 1979 [9] weiter modifiziert, konnte 1982 [21] noch um ein paar Schritte verbessert werden.

Der Nachweismethode liegt folgende Idee zugrunde :

Über das Polyacrylamidgel wird nachdem die elektrophoretische

C6-Auftrennung abgeschlossen ist, als Entwicklungssystem ein Agarosegel darübergerlegt (= Overlay). Die Zusammensetzung dieses Gels besteht im wesentlichen aus Schafer erythrozyten, Ambozepter und einem C6-defizienten Kaninchenserum, so daß die Lyse der Erythrozyten aufgrund der inkompletten Komplementkaskade nicht erfolgen kann. Die Lyse tritt erst ein, wenn aus dem Polyacrylamidgel die aufgetrennten C6-Moleküle in das Agarosegel eindiffundieren. So können bei geeigneter Wahl der Entwicklungszeit anhand der Lysevorgänge an den Stellen der aufgetrennten C6-Moleküle die einzelnen Bandenmuster abgelesen werden.

5.6.2. Immunfixation

Die zu untersuchenden Proteine liegen im Plasma in qualitativ geringen Mengen vor, so daß der Nachweis per se einer empfindlichen Methode bedarf. Diese ist mit der Immunfixation gegeben. Dabei wird das immunologische Prinzip der Antigen-Antikörper-Bindung ausgenutzt, indem das aufgetrennte Genprodukt als Antigen mit einem entsprechenden Antikörper zusammengebracht wird. Die Reaktion ist von der Konzentration und den Eigenschaften der Reaktionspartner sowie den physiko-chemischen Begleitumständen abhängig.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal für die Klassifizierung der sechsten Komplementkomponente die Immunfixation im Anschluß an die Isoelektrofokussierung angewandt. Für den Nachweis sind folgende Schritte erforderlich : ein Celluloseacetatstreifen (Millipore ESWP 050 FO) wird mit dem entsprechenden monospezifischen Antikörper getränkt und für ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Unmittelbar nach Beendigung der Fokussierung

wird der Streifen in Höhe der aufgetrennten C6-Komponenten auf das Gel gebracht, nach der erforderlichen Reaktionszeit wieder entfernt und über Nacht in physiologische NaCl-Lösung gelegt. Damit sollen überschüssige Antikörper und nicht fixiertes Protein aus dem Streifen gewaschen werden. Danach wird der Streifen mit einem Proteinfarbstoff gefärbt.

5.6.3. Färbung

Das aufgetrennte Protein kann nach der Immunfixation durch eine Färbung sichtbar gemacht werden. Für den Nachweis der C6-Komponente wurde Coomassie Brilliant Blau R 250 (Serva Blau R) verwendet. Dieser Triphenylmethanfarbstoff besitzt eine hohe Spezifität und Affinität zu Protein. Er zeichnet sich durch kurze Färb- und Entfärbezeiten aus.

Zusammensetzung der Färbelösung für den Fixierstreifen :

1,2 g Coomassie Brilliant Blau R 250

2400 ml Entfärberlösung

Entfärberlösung :

500 ml Methanol

100 ml Eisessig

400 ml Aqua dest.

Um den nicht proteingebundenen Farbstoff vom Fixierstreifen zu entfernen, legt man ihn kurzfristig in die Entfärberlösung.

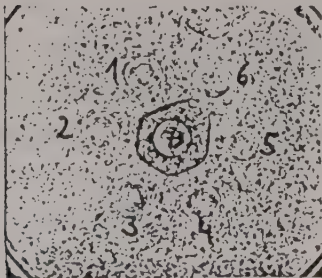
5.6.4. Antikörper

Als monospezifischer Antikörper wurde Anti-Human C6 Ziegenserum der Firma Cappel Lab. (Antiserum Lot 19 128) verwendet.

Um die Aktivität zu testen und das optimale Konzentrationsverhältnis zu ermitteln, wurden zwei Vorversuche mit der doppelten Geldiffusionsmethode nach Ouchterlony [17] angelegt.

Dazu wurde ein Objektträger und eine Rundschale mit Agar beschichtet. In den Agar wurden nach üblicher Anordnung sechs auf einer Kreisbahn befindliche Löcher um ein zentrales Loch gestanzt. Das zentrale Loch wurde mit Humanserum gefüllt und in die umliegenden Löcher kamen C6-Antikörperlösungen mit fallender Konzentration, sowie eine Kontrollprobe. (Abb. 13 und Abb. 14).

Rundschale:



Loch 1: Antikörper (Ak)
unverdünnt

Loch 2: Ak 1 : 1

Loch 3: Ak 2 : 1

Loch 4: Ak 3 : 1

Loch 5: Ak 4 : 1

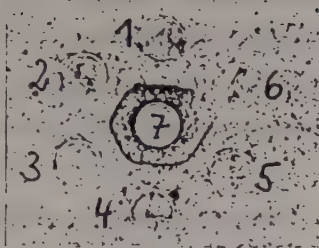
Loch 6: Aqua dest.

Loch 7: Humanserum

Abb. 13

Als Verdünnungslösung wurde Aqua dest. verwendet.

Objektträger:



Loch 1: Antikörper (Ak)
unverdünnt

Loch 2: Ak 1 : 1

Loch 3: Ak 2 : 1

Loch 4: Ak 3 : 1

Loch 5: Ak 4 : 1

Loch 6: Phosphatpuffer

Loch 7: Humanserum

Abb. 14

Als Verdünnungslösung wurde Phosphatpuffer pH = 7,3 verwendet.

Die Versuche zeigten eine deutliche Reaktion des Antikörpers mit dem Humanserum. Wie erhofft zeigten beide Leerproben keine Präzipitationslinien mit dem Humanserum, so daß eine unspezifische Präzipitation ausgeschlossen werden konnte. Da zwischen dem unverdünnten Antikörper und dem 4 : 1 verdünnten Antikörper fast kein Unterschied in der Präzipitationsstärke bestand, wurde auf einen hohen Antikörpertiter geschlossen.

Die Versuche mit zwei verschiedenen Verdünnungslösungen - Aqua dest. und Phosphatpuffer - wurden notwendig, da die Firma Cappel zur Lösung des lyophilisierten Antikörpers Phosphatpuffer empfiehlt; die Versuche ergaben, daß Aqua dest. als Lösungsmittel ebenso geeignet war und darüberhinaus die Handhabung des Antikörpers erheblich vereinfachte.

6. Ergebnisse

In den verschiedenen Versuchsansätzen zur Immunfixation wurde jeweils an einer der Variablen - Antikörperkonzentration, Kontaktzeit und Reaktionstemperatur - eine Änderung vorgenommen.

Die Antikörperkonzentration wurde, gestützt auf die Vorversuche nach Ouchterlony, zunächst in der Verdünnung 6 : 1 angewandt und später stufenweise erhöht.

Die Kontaktdauer der Acetatfolie mit dem Polyacrylamidgel wurde beginnend mit 90 sec. unter annähernder Verdopplung der Zeiten auf 20 min. ausgedehnt.

Die Antigen-Antikörperreaktion wurde bei 10°C, Raumtemperatur und bei 37°C getestet.

Die daraus resultierende Versuchsanordnung zur Immunfixation ist in der folgenden Tabelle 7 zusammengefaßt.

Antikörperkonzentration	unver- dünnt	1:1	2:1	3:1	4:1	5:1	6:1
Kontaktzeit	90 sec	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.		
Reaktionstemperatur	10 °C	Raumtemp.			37 °C		

Tab. 7

Die Verdünnungsschritte wurden mit Aqua dest. als Verdünnungsmittel durchgeführt.

Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Kontaktzeiten und Reaktionstemperaturen (siehe Tabelle 7), konnte bei der ersten Verdunnungsstufe (6:1) kein positiver C6-Nachweis erbracht werden.

Bei der nächst niedrigeren Verdunnungsstufe (5:1) wurde hinsichtlich variabler Kontaktzeiten und Reaktionstemperaturen in gleicher Weise verfahren, wobei die Resultate ebenfalls negativ waren. Dieses Procedere wurde konsequent mit gleichmäßigem Anstieg der Antikörperkonzentration von 4 : 1, 3 : 1, 2 : 1, 1 : 1 bis schließlich unverdünnt durchgeführt.

Die Ergebnisse aller Versuchsanordnungen waren negativ.

Die für die sechste Komponente des Komplementsystems charakteristischen Bandenmuster, wie sie von der Overlay - Technik her bekannt sind, konnten auf der mit Anti-C6-Antikörpern versetzten Acetatfolie nicht dargestellt werden.

7. Diskussion und Zusammenfassung

Blutgruppen und Blutfaktoren zeichnen sich gegenüber anderen anthropologischen Merkmalen dadurch aus, daß sie monogen erblich und weitgehend umweltstabil sind. Die Entwicklung verfeinerter Nachweismethoden hat in den vergangenen Jahren die Darstellung einer Fülle von genetisch determinierten Systemen ermöglicht. Aus der Reihe der Komplementkomponenten dürfte, wie in 3.6.1. dargestellt, nur C6 die Kriterien für den Eingang in die praktische Paternitätsbegutachtung erfüllen.

Aufgrund der relativ großen Anzahl der Allele und der günstigen Verteilung der Phänotypen von C6 kann eine zusätzliche Erhöhung der bereits bestehenden allgemeinen Vaterschaftsausschlußchance erzielt werden.

Die bisherige C6-Auftrennung mit der Isoelektrofokussierung im Polyacrylamidgel mit anschließendem Agarose-Overlay ist ein zeitaufwendiges und kompliziertes Nachweisverfahren, das für die routinemäßige C6-Bestimmung in der Vaterschaftsbegutachtung weniger geeignet ist.

Eine wesentlich einfachere und elegantere Form des C6-Nachweises würde die Immunfixation darstellen, mit der bereits eine Reihe anderer Proteine bestimmt werden. Leider ist in dieser Arbeit der C6-Nachweis mittels der Immunfixation nicht geglückt. Eine fehlerhafte Auftrennung der C6-Moleküle kann ausgeschlossen werden, da das Verfahren der isoelektrischen Fokussierung im Polyacrylamidgel als reproduzierbare Methode erprobt und anerkannt ist.

Ebenso wurde die Technik der Immunfixation per se nach üblicher Weise unter Verwendung von antikörperhaltiger Acetatfolie mit

anschließender Färbung angewandt. Trotz einzelner Änderungen der bei dieser Technik vorhandenen Variablen - Antikörperkonzentration, Reaktionsdauer und -temperatur - konnte der Proteinnachweis nicht geführt werden. Die Fehlersuche kann somit nur spekulativ angegangen werden :

Die Reaktivität des verwendeten Anti-C6-Antikörpers konnte anhand der Vorversuche nach Ouchterlony bestätigt werden. Der Grad der Spezifität des Antikörpers ist in Ermangelung eines C6-defizienten Serums nicht eindeutig nachgewiesen, wegen der klaren Präzipitationslinien bei den oben angegebenen Verdünnungen jedoch wenig in Zweifel zu stellen.

Unabhängig davon besteht die Möglichkeit, daß die Kombination von Polyacrylamidgel und Immunfixation mit der Acetafolie eine bislang nicht bekannte bzw. C6-spezifische Hemmung der Antigen-Antikörper-Bindung verursachen könnte.

Während eine andere Forschungsgruppe [27], zu einem etwas späteren Zeitpunkt als meine Untersuchungen durchgeführt worden sind, mit dergleichen Versuchsanordnung ebenso kein positives Ergebnis erbringen konnte, ist inzwischen einer Gruppe in Japan [18] der erfolgreiche C6-Nachweis mit der Immunfixation gelungen. Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß die Auftrennung der C6-Moleküle nicht im Polyacrylamidgel sondern in einem Agarosegel erfolgte. Dies bestärkt, zumindest indirekt, die oben angeführte Vermutung, daß für den C6-Nachweis die Kombination von Polyacrylamidgel und Immunfixation mittels Acetatfolie als ungeeignet angesehen werden muß.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die genetische Konstellation des C6-Systems mit einer isolierten Ausschlußwahrscheinlichkeit

von 17,18 % eine weitere Verbesserung und Erhöhung der gesamten Ausschußchance in der Paternitätsbegutachtung bedeuten würde. Die routinemäßige Anwendung setzt eine genaue, jedoch technisch relativ einfache Nachweismethode voraus. Sowohl die Methode der Lyse-Technik als auch die in dieser Arbeit untersuchte Technik sind dafür ungeeignet. Mit dem neuen, aus Japan kommenden Verfahren, könnte die Aufnahme des C6-Systems in die Paternitätsbegutachtung Zukunft haben.

8. Literaturverzeichnis

1. Dewald, G. und Rittner, Ch.:

Polymorphism of the Second Component of Human Complement (C2).

Vox Sang. 37, 47 - 54 , 1979

2. Glass, D., Raum, D., Balavitch, D., Kagan, E., Rabson, A., Schur, P.
und Alper, C.A.:

Inherited Deficiency of the sixth component of complement:

A silent or a null gene.

J. Immunology 120 , 538 , 1978

3. Harris, H.:

Enzyme polymorphism in man.

Proc. Roy Soc. 164 , 298 , 1966

4. Humphrey, J.H.:

Immunology for Students of Medicine

Third Edition 1970

Blackwell Scientific Publications

5. Hobart, M.J., Lachmann, P.J.:

Allotyps of complement components in man.

Transplantation Revue 32 , 26 , 1976

6. Hobart, M.J., Lachmann, P.J. und Alper, C.A.:

Polymorphism of human C6.

Peters, K., Hrg. Protides of the Biological Fluids

Oxford , Pergamon Press 1975

7. Hobart, M.J., Lachmann, P.J. und Calne, R.Y.:
C6 : Synthesis By The Liver In Vivo.
Journal of Experimental Medicine, Bd. 146, 629, 1877
8. Jungermann, K. und Möhler, H.:
Biochemie
Springer Verlag 1980
9. Kühnl, P. und Kreckel, P.:
C6 phenotyps and allel frequencies in a german population.
Immunbiology 158 , 1980
10. Kunstmann, G., Mauff, G. und Pulverer, G.:
C6 polymorphism and rare alleles in Western Germany
Immunbiology 158 , 55 , 1980
11. Landsteiner, K.:
Über Agglutinationserscheinungen normaler menschlicher Blute.
Wien. Klin. Wschr. 14 : 1132 , 1901
12. Lewontin, R.C.:
An estimation of average heterozygosity in man.
Am. J. Hum. Genet. 19 : 681 - 685 , 1967
13. Mauff, G., Kunstmann, G. und Pulverer, G.:
C6 Polymorphism : Population Distribution and Application
To Paternity Testing.
8th International Congress for Soc. Forensic Haematogenetics
London 1979
Kongressband 119 - 121

14. Mauff, G. und Rittner, Ch.:
Statement on the Nomenclature of Human C6 Polymorphism
Immunobiology 158 , 139 , 1980
15. Müller - Eberhard, H.J. und Schreiber, R.D.:
Molecular Biology and Chemistry of the Alternative Pathway
Of Complement.
Advances in Immunology, Vol. 29 , 1980
16. Müller - Eberhard, H.J.:
The Complement System.
The plasma proteins - Structure, Function and Genetic
Control.
Vol. I , 1975
17. Niederländische Gesellschaft für Immunologie :
Einführung in die Immunologie
Gustav Fischer Verlag UTB
Stuttgart 1975
18. Nishimukai, H.:
C6 Polymorphism in Japanese : Typing By Agarose Gel Isoelectric
Focusing - Immunfixation.
Hum. Hered. 35 (1), 30 : 3 , 1985
19. Olving, J.H., Olaisen, B., Teisberg, P., Gedde-Dahl, T. jr. und
Thorsby, E.:
Nonlinkage between C6 and Chromosome 6 Markers.
Human Genetics 37 , 125 , 1977

20. Olaisen, B., Teisberg, P., Gedde-Dahl, T., jr. und Thorsby, E.:
Genetic Polymorphism of the Second Component of Human
Complement (C2).

Human Genetics 42 , 301 - 305 , 1978

21. Prex, G.:

Untersuchung des humanen C6-Polymorphismus' im süddeutschen
Raum : Methode und Verwendbarkeit in der forensischen Serologie.
Diplom - Arbeit , 1982

22. Filbe, H.:

In Catsimpoolas N (ed) Isoelectric Focusing.
Acad Press Inc. , 13 - 52
New York 1976

23. Rittner, Ch., Dewald, G., Berghoff, E. und Mollenhauer, E.:

C6 Polymorphismus der sechsten Komplementkomponente.
Z. Rechtsmedizin 83 , 17 , 1979

24. Rittner, Ch.:

Begründung für eine serologische Zweistufen-Begutachtung im
Abstammungsprozeß.
Neue Jurist. Wschr. , 1974

25. Roitt, I.:

Essential Immunology
Third Edition 1978
Blackwell Scientific Publications

26. Tiselius, A.:

A new apparatus for elektrophoretic analysis of colloidal
Mixture.

Trans Faraday Soc., 33 : 524 , 1937

27. Weidinger, S..

Institut für Anthropologie und Humangenetik der LMU München.

28. Wiesmann, E.:

Medizinische Mikrobiologie

Georg Thieme Verlag

Stuttgart 1978

Lebenslauf

Name: Günter, Rudolf, Otto F R E X

Wohnort: Milbertshofener Str.57 b, 8000 München 40

geboren am: 17. Februar 1951

in: München

Familien-
stand: verheiratet - ein Kind

Ehefrau: Evelyne, geb. Geisberger, Dipl. Biologin

Eltern: Vater: Otto Prex, techn. Angestellter in Ruhe
Mutter: Berta Prex, kaufm. Angestellte in Ruhe

Schul -
bildung: 1957 - 1962 Volksschule in Lohhof
1962 - 1969 math.-nat. Gymnasium, Freising
1969 - 1972 priv. math.-nat. Gymnasium Dr. Merz,
München
1972 - 1973 math.-nat. Gymnasium, Dachau

Prüfungen: Zeugnis der Reife im Mai 1973

Sport: 1968 bayer. Jugendmeister im Judo

Hochschul-
ausbildung: 1973 - 1976 Studium der Physik und Elektrotechnik an
der TU München und LMU München
1976 - 1982 Studium der Biologie an der LMU München
Fächerkombination im Hauptstudium:
Anthropologie und Humangenetik
Mikrobiologie
Immunologie
1982 Verleihung des akademischen Grades eines
Diplom-Biologen

ab 1980 Studium der Medizin an der LMU München

1982 ärztl. Vorprüfung

1983 I. Abschnitt der ärztl. Prüfung

1985 II. Abschnitt der ärztl. Prüfung

1986 III. Abschnitt der ärztl. Prüfung

5. Dez. 1986 Approbation als Arzt

1982 - 1983 Promotion am Institut für Rechtsmedizin

der LMU München mit dem Thema :

Betrachtung der sechsten Komplement -

Komponente des Menschen in der Paternitäts-

begutachtung und Versuch der Darstellung

anhand der Immunfixation.

seit 23. Feb. 1987 Assistenzarzt für Orthopädie an der AHB -

Klinik Bad Griesbach

München, den 28. Februar 1987

Heiter

